

氏名	南雲 義之		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10378 号		
学位授与年月	令和 4 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>PLD1 promotes tumor invasion by regulation of MMP-13 expression via NF-<math>\kappa</math>B signaling in bladder cancer</b> （ホスホリパーゼ D1 は NF- $\kappa$ B シグナル経路を介した MMP-13 の発現制御を介して膀胱癌の浸潤を促進する）		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	関根 郁夫
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	越智 寛幸
副査	筑波大学講師	博士（医学）	石井 良征
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川西 邦夫

## 論文の内容の要旨

南雲義之氏の博士学位論文は、ホスホリパーゼ D (phospholipase D: PLD) による膀胱癌浸潤促進の機序を世界で初めて明らかにしたもので、その要旨は以下のとおりである。

### 【目的】

膀胱癌の進行においてがん細胞が粘膜下層、膀胱筋層へと浸潤していく過程が極めて重要である。PLD は、生体膜に存在するリン脂質であるホスファチジルコリンをホスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA) とコリンに加水分解する代謝酵素で、PA を介して様々な細胞機能に関与している。著者らのグループは、PLD が腎細胞癌組織で発現が亢進し、患者の予後不良因子であることを示した。しかし、膀胱癌の進展における PLD の意義は分かっていない。そこで著者は、膀胱癌の浸潤メカニズムにおける PLD の役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

### 【方法】

著者は、ヒト非浸潤性膀胱癌 (RT112、RT4) とヒト筋層浸潤性膀胱癌 (T24、5637、253J、TCC-sup) 細胞株を 10% FBS 添加 RPMI 培地で培養している。PLD1 の shRNA は、pLKO.1 レンチウイルスベクターを用いて作成し、5637 細胞株と 253J 細胞株に添加して 24 時間培養し、ピューロマイシン添加 RPMI 培地を用いて shControl 株と shPLD1 株を選択している。細胞浸潤アッセイは、BioCoat Matrigel invasion chamber に  $5 \times 10^5$  個に調整した細胞懸濁液を播種し、22 時間培養後にメンブレン下面の浸潤細胞を固定・染色して光学顕微鏡 (200 倍) で観察・カウントしている。さらに著者は、6-8 週齢の雌 C57/BL/6 マウスと 6-8 週齢の雌 PLD1 ノックアウト (PLD1-KO) マウス (*PLD1*<sup>-/-</sup>) に、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を自由飲水させてマウス膀胱発癌モデルを作成している。著者は、定量 PCR、パスウェイ遺伝子解析、RNA シークエンス解析およびウエスタンブロット解析を汎用されている方法で行っている。測定値の 2 群間比較は Student *t*-test で、生存解析では Kaplan-Meier 法にて全生存率を算出し、log-rank test で 2 群間比較を行っている。相関は Pearson の相関分析で検討している。

### 【結果】

著者は、まず PLD1 高発現が予後不良因子であることを The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを使って明らかにし、次に 5637 株と 253J 株で PLD1 蛋白が高発現していることを見いだしている。

そこで著者は、この2つの細胞株において shRNA を用いた PLD1 遺伝子発現抑制を行い、細胞浸潤アッセイでこれら2つの PLD1 発現抑制株がそれぞれのコントロール株よりも有意に細胞浸潤が抑制されていることを示している。次に著者は、PLD1 を介した細胞浸潤の機序を明らかにするために、PLD1 発現抑制株とそのコントロール株において細胞浸潤に関連するパスウェイ遺伝子の mRNA 発現変動解析を行い、168 遺伝子のうち 23 遺伝子が PLD1 発現抑制株で有意に発現が低下していることを示している。次に著者は、これら 23 遺伝子について、TCGA データを用いた *in silico* 解析で膀胱癌患者の予後および PLD1 発現レベルとの相関により選別し、ANOS1、ICAM1、MMP-9、MMP-13 の 4 遺伝子を候補として挙げている。次に著者は、これら 4 遺伝子の mRNA 発現レベルを 5637 株および 253J 株の PLD1 発現抑制株とそのコントロール株でそれぞれ調べ、PLD1 遺伝子発現抑制により、両細胞株において有意な発現低下を認めるのは MMP-13 だけであることを示している。さらに著者は、5637 株と 253J 株の MMP-13 発現抑制株を作成し、MMP-13 発現抑制株はコントロール株と比べて細胞浸潤が有意に抑制されていることを確認している。以上より著者は、PLD1 は MMP-13 の発現制御を介して細胞浸潤を促進することを明らかにした。

上記に引き続き、著者は野生型マウスと PLD1-KO マウスにおける膀胱発癌モデルの浸潤性膀胱癌の発生割合を比較し、PLD1-KO マウスにおいて浸潤癌の割合が低いことを示している。さらに膀胱サンプルにおける MMP-13 mRNA 発現レベルを定量 PCR で経時的に検討し、PLD1-KO マウスでは著明な発現レベルの低下を認めている。次に膀胱サンプルの網羅的トランスクリプトーム解析を用いて野生型マウスと PLD1-KO マウスでは 538 個の遺伝子の発現が異なることを見いだしている。この 538 発現変動遺伝子におけるパスウェイ解析を行ったところ、野生型マウスと比較して、PLD1-ノックアウトマウスでは結合組織の分解や細胞浸潤に関連する遺伝子発現の低下を認め、特に MMP-13 を含む MMP の阻害を認めている。次に著者は、MMP-13 発現制御に関わる転写制御因子を明らかにするため上流制御因子解析を行ったところ、Nfkb1-RelA が PLD-KO マウスと比較して野生型マウスでより高い活性を認め、さらにこの Nfkb1-RelA が制御する下流シグナル分子として MMP-13 の存在を確認している。5637 株と 253J 株ともに PLD1 遺伝子発現抑制株において NF- $\kappa$ B p65 Ser536 のリン酸化レベルの低下を認め、I $\kappa$ B $\alpha$  タンパク発現レベルは両細胞株ともに PLD1 遺伝子発現抑制株において亢進を認めている。さらに、著者は NF- $\kappa$ B p65 タンパクをコードする遺伝子である RELA に対して siRNA を用いて遺伝子発現抑制を行い、両細胞株ともに NF- $\kappa$ B p65 タンパク発現レベル低下、NF- $\kappa$ B p65 Ser536 のリン酸化レベル低下、MMP-13 mRNA 発現レベル低下を認めている。これらの変化は、PLD1 により産生される PA の添加によって発現レベルの有意な回復することを確認している。

#### 【考察】

これらの結果は、PLD1 の遺伝子発現抑制によって MMP-13 の発現が抑制され、がん細胞浸潤が抑制されることを示している。さらに、PLD1 遺伝子発現抑制株において PLD1 により産生される PA の添加により MMP-13 の発現が亢進したこと、PLD 遺伝子強制発現によって細胞浸潤が亢進することを示した報告があることより、著者は PLD1 遺伝子が MMP-13 の発現亢進を介して膀胱癌細胞の浸潤を促進すると考察している。

## 審査の結果の要旨

#### 【批評】

本研究は、膀胱癌における PLD と細胞浸潤の関係を世界で初めて明らかにしたものである。*in vitro*, *in vivo* 共に PLD1 発現を低下させてその影響を評価したもので、遺伝子を強制発現させて細胞の機能変化を観察する従来の実験方法の欠点を補ったものである。得られた実験結果から生じた新たな疑問を一つ一つ丁寧に考察して次の実験へと進んでいる。論文全体として論理が整然としており、その意味でも模範的な博士論文となっている。

令和 4 年 1 月 12 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。